

①⑨ RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

①⑪ N° de publication :
(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

2 743 086

②① N° d'enregistrement national : **95 15556**

⑤① Int Cl⁸ : C 12 N 15/79, C 12 N 5/10, 1/21, A 61 K 48/00 //
(C 12 N 1/21, C 12 R 1:19)

①②

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②② Date de dépôt : 27.12.95.

③⑦ Priorité :

④③ Date de la mise à disposition du public de la
demande : 04.07.97 Bulletin 97/27.

⑤⑥ Liste des documents cités dans le rapport de
recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du
présent fascicule.*

⑥⑦ Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

⑦① Demandeur(s) : INSTITUT PASTEUR — FR.

⑦② Inventeur(s) : GOUSSARD SYLVIE, GRILLOT
COURVALIN CATHERINE et COURVALIN PATRICE.

⑦③ Titulaire(s) :

⑦④ Mandataire : REGIMBEAU.

⑤④ TRANSFERT DE GENES DANS DES CELLULES EUCARYOTES A PARTIR DE BACTERIES E. COLI.

⑤⑦ La présente invention concerne un système vectoriel capable de délivrer un fragment d'ADN étranger dans des cellules cibles eucaryotes, caractérisé en ce qu'il comprend une souche recombinante E. coli non pathogène et capable de pénétrer dans le cytoplasme desdites cellules, mais incapable d'y survivre, ladite souche E. coli étant en outre transformée par ledit fragment d'ADN étranger.

FR 2 743 086 - A1



La présente invention concerne le transfert direct d'ADN dans des cellules eucaryotes et en particulier dans des cellules de mammifères. Plus particulièrement, la présente invention fournit un système vectoriel capable de délivrer un fragment d'ADN d'intérêt étranger dans des cellules cibles eucaryotes déterminées, notamment de mammifères.

Il n'existe pas actuellement de système à la fois efficace et dénué d'actions secondaires pour l'introduction d'un gène dans des cellules de mammifères. Les recherches sur les systèmes vectoriels, notamment dans le cas du traitement de la mucoviscidose avec le transfert du gène CFTR, ont porté principalement sur les virus, adénovirus notamment, et les liposomes, qu'ils contiennent du cDNA du mRNA ou de la protéine CFTR tels que décrits dans WO94/10323.

On connaît des bactéries ayant acquis des gènes permettant l'invasion ainsi que leur dissémination intercellulaire dans des cellules eucaryotes, notamment de mammifères. On entend ici par "invasion" la faculté de pénétrer à travers la membrane et d'atteindre le cytoplasme par lyse des membranes des vacuoles.

On a décrit dans Infection and Immunity, vol. 62, n° 5, 1994, pp. 1169-1676, Schödel et al. un système de vaccination dans lequel on utilise une bactérie Salmonella typhimurium et sa faculté invasive, ladite bactérie étant transformée par de l'ADN codant une protéine immunogène du virus de l'hépatite B (HBcAg - preS). Dans ce système l'ADN codant n'est pas transféré aux cellules eucaryotes, mais ladite protéine est produite par la bactérie elle-même.

On a décrit dans FR 2 686 896 un système de vaccination dans lequel on utilise des mutants atténués de Listeria monocytogenes qui confèrent à des hôtes auxquels ils ont été administrés une protection contre une infection ultérieure par une souche pathogène de listeria monocytogenes.

A ce jour, le transfert d'ADN à des cellules eucaryotes via des procaryotes n'a pu être obtenu que dans certains cas particuliers pour une levure de E. coli à Saccharomyces (1) et une plante de Agro-bacterium tumefaciens à Nicotania plumbaginifolia (2).

5

L'article de Sadoff et al. (Science Vol. 270, 13 octobre 1995) décrit une bactérie Shigella Flexneri atténuée utilisée comme véhicule pour délivrer de l'ADN dans des cellules épithéliales de mammifères.

10

Selon la présente invention, la bactérie E. coli est modifiée génétiquement de sorte que :

- 1) elle est capable de pénétrer et d'atteindre le cytoplasme de cellules eucaryotes cibles déterminées,
- 2) elle est rendue incapable de se multiplier et de survivre dans
15 lesdites cellules, notamment en lysant dès son entrée dans le cytoplasme desdites cellules eucaryotes ;
- 3) la bactérie est transformée par de l'ADN d'intérêt à transférer, notamment via un vecteur navette procaryote-eucaryote, de préférence réplcatif dans ladite bactérie E. coli et réplcatif ou
20 intégratif dans lesdites cellules eucaryotes hôtes cibles.

Plus précisément, la présente invention a pour objet un Système vectoriel capable de délivrer un fragment d'ADN étranger dans des cellules cibles eucaryotes, caractérisé en ce qu'il comprend une souche
25 recombinante E. coli non pathogène et capable de pénétrer dans le cytoplasme desdites cellules, mais incapable d'y survivre, ladite souche E. coli étant en outre transformée par ledit fragment d'ADN étranger.

Les expressions "système vectoriel" et "cellule cibles" reflètent que
30 la souche E. coli est utilisée ici comme moyen de transfert de l'ADN étranger dans lesdites cellules eucaryotes et non comme bactérie hôte pour l'expression dudit fragment d'ADN, celle-ci pouvant avoir lieu le cas échéant dans lesdites cellules cibles après pénétration de la bactérie dans le cytoplasme. Ce système vectoriel couvre également la souche
35 recombinante d'E. coli telle que définie ci-dessus.

Par "fragment d'ADN" on entend toute séquence nucléotidique comportant ou non des sites de restriction enzymatique. De manière préférentielle, le fragment comporte entre 20 pb et 30 kpb. On peut utiliser comme fragment d'ADN un fragment d'ADN provenant d'un ADN génomique ou d'un ADN complémentaire. A titre d'exemple, le fragment d'ADN est constitué par un fragment d'ADNc de 2kb codant pour la protéine CFTR.

On entend par "fragment d'acide nucléique étranger" un fragment d'acide nucléique qui n'est pas présent dans les cellules cibles. Il peut s'agir d'un fragment exogène, c'est-à-dire qui n'est pas présent normalement dans les cellules cibles de manière endogène, mais il peut s'agir également d'un fragment qui est déjà présent dans les cellules cibles de manière endogène, mais qui ne s'exprime pas ou dont on veut modifier ou réguler l'expression.

Selon la présente invention, on modifie le tropisme cellulaire de souche E. coli qui, par définition, ne possède pas de tropisme spécifique pour lesdites cellules eucaryotes cibles.

Avantageusement, ledit fragment d'ADN étranger comporte un fragment d'ADN codant pour une protéine d'intérêt, ce dernier fragment étant placé sous le contrôle d'éléments de régulation dans lesdites cellules cibles eucaryotes.

On entend par "éléments de régulation" les séquences régulatrices appropriées pour la transcription puis la traduction telles que promoteur, y compris codons "start" et "stop", "enhancer" et "opérateur". Les moyens et méthodes pour identifier et sélectionner ces éléments sont bien connus de l'homme de l'art.

Dans un mode de réalisation avantageux, ladite souche est transformée par un vecteur répliatif ou non dans E. coli portant ledit fragment d'ADN et éventuellement lesdits éléments de régulation.

On utilise donc une bactérie E. coli capable de pénétrer et d'atteindre le cytoplasme des cellules eucaryotes cibles. Une telle souche est modifiée génétiquement par des gènes provenant d'une ou plusieurs autres bactéries ayant cette propriété.

5

La fonction de reconnaissance et de pénétration de la membrane cellulaire et la fonction de lyse des membranes des vacuoles ou phagosomes, cette dernière permettant d'atteindre le cytoplasme, peuvent être conférées par un ou plusieurs gènes distincts notamment deux sens
10 distincts.

Lorsque la spécificité de pilotage vers lesdites cellules cibles particulières est conférée par un gène provenant d'une autre bactérie codant pour la faculté de pénétrer spécifiquement lesdites cellules cibles,
15 c'est le choix du gène responsable de la reconnaissance et pénétration de la membrane cellulaire qui confère la spécificité du pilotage. Lesdites cellules eucaryotes cibles peuvent être des cellules animales, notamment des cellules de mammifères, en particulier des cellules humaines, ou des cellules de levures ou encore des cellules de plantes.

20

La nature de la bactérie d'origine du gène responsable de la reconnaissance et pénétration spécifique dans les cellules cibles déterminées, utilisé selon la présente invention, confère au système vectoriel de l'invention, une spécificité de pilotage vers un type de
25 cellules eucaryotes cibles, en particulier des cellules de mammifères notamment humaines, correspondant au spectre d'hôte cellulaire de ladite bactérie.

La plupart des bactéries pathogènes intracellulaires ont la capacité
30 d'invasion dans les cellules épithéliales humaines (3). Toutefois, si ces bactéries sont dotées de la capacité de pénétrer dans certaines cellules cibles, elles ont souvent un effet pathogène. C'est pourquoi, il est avantageux d'utiliser selon la présente invention une bactérie E. coli non pathogène, notamment une souche issue de la souche E. coli K12, modifiée
35 par un gène d'une autre bactérie.

Ainsi à titre illustratif on utilisera :

- un gène ou un ensemble de gènes de la bactérie Salmonella typhimurium pour transférer de l'ADN dans des cellules de tissus lymphoïdes et des cellules hépatiques ;
- 5 - un gène ou un ensemble de gènes de la bactérie Shigella flexneri pour transférer de l'ADN dans des cellules épithéliales de mammifères ;
- un gène de la bactérie du genre Légionella, notamment Legionella pneumophila, notamment pour transférer de l'ADN plus
- 10 spécifiquement dans des cellules épithéliales du poumon ;
- un gène de la bactérie Listeria monocytogenes pour transférer de l'ADN dans des cellules épithéliales du système nerveux central,
- un gène de la bactérie du genre Yersinia, notamment Yersinia pseudotuberculosis ou enterocolitica pour transférer de l'ADN dans
- 15 des cellules épithéliales, et
- un gène de bactérie du genre Mycobactérium notamment tuberculosis, avium complex, scrofulaceum pour transférer de l'ADN dans des macrophages.

20 Ainsi dans un mode de réalisation illustrant cet aspect de l'invention, on a construit une bactérie E. coli modifiée par le gène d'invasion de la bactérie Shigella Flexneri.

Shigella flexneri est une espèce bactérienne pathogène pour

25 l'homme responsable de la dysenterie bacillaire difficilement transformable par de l'ADN exogène et riche en endonucléase. Cette espèce bactérienne héberge le plasmide pWR100 contenant l'opéron d'invasion ipa (invasion plasmide antigen), qui lui permet d'entrer et se multiplier dans les cellules épithéliales des mammifères. Le plasmide

30 pWR100 (4) confère à E.coli K12 les propriétés d'entrée et de modification intracellulaire et dissémination intercellulaire dans les cellules de mammifères (5).

Le plasmide pWR100 de Shigella Flexneri code les deux fonctions de pénétration et de dissémination intracellulaire par lyse des membranes des vacuoles. Cependant il peut être avantageux, comme on l'a vu, de transformer la bactérie E. coli selon l'invention par deux gènes exogènes
5 provenant de bactéries différentes. On peut utiliser en particulier le gène de l'hémolysine de Listeria monocytogenes ou le gène de l'hémolysine présent dans certaines bactéries E. coli pathogènes, gène d'environ 2kb qui confère la capacité de dissémination intracellulaire en lysant les membranes des vacuoles. On peut également utiliser le gène d'invasion de
10 la bactérie Yersinia enterocolitica ou pseudotuberculosis pour conférer la capacité d'entrer dans les cellules.

Les mycobactéries ont la propriété de pénétrer dans les cellules mais elles ne lysent pas les membranes des vacuoles. Dans un mode de
15 réalisation, on utilise un gène de mycobactérie responsable de la pénétration cellulaire et un gène d'hémolysine de E. coli ou Listeria monocytogenes.

La souche de E. coli peut être rendue incapable de se multiplier et de
20 survivre dans les cellules eucaryotes de multiple façons, en particulier en la rendant auxotrophe pour un facteur nécessaire à sa survie et absent des cellules eucaryotes.

Dans le mode de réalisation préféré selon l'invention, la bactérie E. coli
25 coli est rendue incapable de survie en lysant dès son entrée dans le cytoplasme des cellules eucaryotes. Pour ce faire, dans le mode de réalisation préféré selon l'invention, ladite souche E. coli a été modifiée de manière à être rendue auxotrophe pour l'acide diaminopimélique qui est un composé essentiel de la synthèse de la paroi bactérienne (6) dont la
30 voie de biosynthèse est bien connue.

Dans un mode de réalisation, la bactérie E. coli est rendue dap- à la
suite d'un double événement de recombinaison homologue dans le gène de structure de la dihydrodipicolinate synthase, auxotrophe pour l'acide
35 diaminopimélique qui est spécifique des procaryotes (7).

Le gène peut être doublement inactivé par délétion et insertion-inactivation dans le gène dapA. L'inactivation de la chaîne métabolique au niveau de la première étape évite l'accumulation dans les cellules d'un intermédiaire métabolique qui peut être métabolisé par une autre enzyme de la cellule. Les deux premières étapes de la synthèse du diaminopimélate qui n'est pas présent dans les cellules de mammifères, sont catalysées par les enzymes codées par les gènes dapA et dapB (7).

Selon la présente invention, le fragment d'acide nucléique étranger est porté par un plasmide réplcatif et non intégratif dans la bactérie. En outre, le fragment d'ADN étranger est placé sous le contrôle d'éléments d'expression fonctionnelle dans les cellules eucaryotes cibles.

Ledit vecteur portant ledit fragment d'ADN étranger peut être réplcatif ou intégratif dans les cellules eucaryotes cibles, c'est-à-dire qu'il peut comporter des éléments permettant l'intégration dans le génome des cellules eucaryotes cibles, ou comporter une origine de réplication permettant au vecteur de se répliquer de façon extra-chromosomique dans les cellules eucaryotes cibles.

La présente invention a également pour objet un système vectoriel selon la présente invention pour une utilisation thérapeutique.

Enfin la présente invention a pour objet une méthode de transfert ex vivo ou in vivo d'ADN dans des cellules eucaryotes, caractérisée en ce qu'on utilise un système vectoriel selon la présente invention.

D'autres caractéristiques et avantages de la présente invention apparaîtront à la lumière du mode de réalisation détaillée qui va suivre.

La description fait référence aux figures 1 à 4 dans lesquelles :

- la figure 1 représente le vecteur pAT497 ;
- la figure 2 représente le vecteur pAT498 ;
- la figure 3 représente la construction de E. coli BM 2710.

- la figure 4 représente la construction de E. coli BM2710/pWR110 dans laquelle x = transfert de plasmide par conjugaison ; Tra⁺ = autotransférable par conjugaison ; Tra⁻ = non autotransférable par conjugaison ; Mob⁺ = mobilisable ; Km^R = résistance à la kanamycine ; Cm^R = résistance au chloramphénicol.

1. Constructions des vecteurs

Les vecteurs, épisomique pAT497(Figure 1) ou intégratif pAT498 (Figure 2) ont été construits.

1.1. Construction du vecteur épisomique pAT497

Ce vecteur est représenté figure 1. Il a été construit à partir du vecteur p220-2 (12)

Le vecteur p220-2 n'est pas intégratif. Il comporte :

- l'origine de réplication de pBR322, fonctionnelle chez E. coli ;
- un gène de résistance à l'ampicilline, bla, s'exprimant chez E. coli ;
- un gène de résistance à l'hygromycine B, hph, s'exprimant chez les cellules eucaryotes grâce au promoteur et au site de polyadénylation de la thymidine kérase du virus de l'Herpès simplex (tk) ;
- les régions EBNA-1 (Epstein-Barr nuclear antigen) et oriP du virus Epstein-Barr qui permettent aux vecteurs de se répliquer de manière extrachromosomique (1 à 9 copies/cellule) dans de nombreuses cellules animales.

Le vecteur construit pAT497 consiste en un plasmide p220-2 (12) dans lequel a été cloné un fragment d'ADN de 4,75 kpb contenant le "large tumor nuclear location signal" (nls) du virus SV40 fusionné au gène lacZ (13). La protéine β -galactosidase de fusion qui en résulte (nls- β -Gal) est enzymatiquement active et reste associée au noyau d'un grand nombre de cellules. La synthèse de cette enzyme est un moyen de criblage rapide de la présence du plasmide dans la cellule réceptrice soit grâce à un test de

coloration des cellules fixées utilisant X-gal comme substrat (10) ; soit à l'utilisation de fluorescéine Di- β -galactopyranoside (fdg) qui permet l'analyse des cellules en suspension, leur tri et leur remise en culture à l'aide d'un "fluorescence activated cell sorter" (FACS). Le gène nls-lacZ s'exprime chez les cellules eucaryotes grâce au promoteur et au site de polyadénylation du virus SV40.

La structure du plasmide pAT497 (p220-2-nls-lacZ) est représentée figure 1. Elle comporte :

- 10 - pBR ori, origine de répllication procaryote ;
- bla gène de structure de la β -lactamase ;
- tk promoteur et tk polyadénylation, promoteur et site de polyadénylation de la thymidine kinase du virus Herpès simplex ;
- hph, gène de structure de l'hygromycine phosphotransférase ;
- 15 - EBNA-1, gène codant pour l'antigène nucléaire du virus Epstein-Barr ;
- ori P, origine de répllication eucaryote permettant au vecteur de se répliquer de façon extrachromosomique (1 à 90 copies par cellule) dans de nombreuses cellules animales ;
- 20 - nls-lacZ, signal de localisation nucléaire de la β -galactosidase ;
- SV early, promoteur précoce du virus SV40 ;
- SVpA, site de polyadénylation de SV40.

Les flèches indiquent la direction de transcription. Le site de coupe par endonucléase de restriction perdu au cours des clonages est indiqué entre parenthèses. La taille de ce plasmide est de 13,650 kpb. Il est composé de :

- un fragment de 8,9 kb XbaI de p220.2 (12) ;
 - un fragment de 4.75 kb KpnI-XbaI contenant le gène nls lacZ.
- 30 Le fragment de 4,75 kb KpnI-XbaI est purifié de l'intermédiaire constitué par un fragment Sall-BamHI de 3.5 kb de pMFG-NB (16) cloné dans le fragment Sall-BglII de 3.26 kb de pSVE₁.

1.2. Construction du vecteur navette procaryote-eucaryote intégratif pAT498.

Le plasmide pAT498 a été construit à partir du vecteur pSG21. Le vecteur pSG21 consiste en l'insertion d'un fragment nls-lacZ de 3,5 kilopaires de bases (kpb) dans le site de clonage multiple du vecteur pRc/CMV (Invitrogen). Ce fragment contient le "large tumor nuclear location signal" (nls) du virus SV40 fusionné au gène lacZ. La protéine β -galactosidase de fusion qui en résulte (nls- β -Gal) est enzymatiquement active et reste associée au noyau d'un grand nombre de cellules. La synthèse de cette enzyme est un moyen de criblage rapide de la présence de plasmide dans la cellule réceptrice soit grâce à un test de coloration des cellules fixées utilisant X-Gal comme substrat (10), soit à l'utilisation de fluoresceine DI- β -D-galactopyranoside (fdg) qui permet l'analyse des cellules en suspension et éventuellement leur tri et leur mise en culture à l'aide d'un "fluorescence activated cell sorter" (FACS). Le gène nls-lacZ s'exprime chez les cellules eucaryotes grâce au promoteur du cytomégalo virus et du site de polyadénylation de l'hormone de croissance bovine. Ce promoteur s'étant avéré fonctionnel également chez E. coli, on a cloné en aval, un terminateur de transcription provenant du bactériophage T4 : ce nouveau vecteur a été désigné pAT498 (Figure 2). Les vecteurs pSG21 et pAT498 comportent une origine de réplication fonctionnelle chez les bactéries, un système permettant l'intégration dans le génome des cellules eucaryotes, un gène de résistance à l'ampicilline s'exprimant chez les bactéries, un gène de résistance au G418 (un dérivé de la gentamicine) s'exprimant chez les cellules eucaryotes.

La structure du plasmide pAT498 (pRc/CMV-nls-lacZ) est représentée figure 2. Elle comporte les éléments suivants :

- pUC ori, origine de réplication procaryote ;
- bla, gène de structure de la β -lactamase ;
- CMV promoter, promoteur et enhancer du cytomégalo virus humain ;
- T7 et Sp6 promoters, production de transcrits RNA sens et antisens;
- T4, terminateur de transcription ;

- nls-lacZ, signal de localisation nucléaire de la β -galactosidase ;
- BGH, site de polyadénylation de l'hormone de croissance bovine ;
- M13, origine de réplication du bactériophage M13 pour la préparation d'ADN simple-brin en vue de la séquence et de la mutagenèse ;
- SV early, promoteur précoce du virus SV40 ;
- neo, gène de structure de l'aminoside phosphotransférase de type II [APH(3')-II] ;
- SVpA, site de polyadénylation de SV40.

Les flèches indiquent la direction de transcription. La taille de ce plasmide est de 8,92 kpb.

Il est composé de :

- un fragment BamHI de 3.5 kb contenant nls lacZ de pMFG-NB ;
- un fragment HindIII - XbaI de pRc/CMV (in vitrogen) de 5,352 bp ;
- un fragment HincII - BamHI de pTB361 (17) contenant le terminateur de transcription du gène 32 du bactériophage T4.

2. Construction de la souche E. coli donatrice

La souche de départ était E. coli MM294 (14) [thi-1, endA1, hsdR17(r_k^- , m_k^+)]. Cette souche est :

- non cytotoxique pour les cellules réceptrices ;
- déficiente en endonucléase ADN spécifique I (endA) et en endonucléase de restriction spécifique d'hôte dans le système de restriction K [hsdR17(r_k^- , m_k^+)]. Par cinq transductions successives à l'aide du bactériophage P1 suivies, dans chaque cas, d'un double événement de recombinaison homologue, a été construite la souche BM2710 (8)(figure 3). Cette dernière est :
- Δ dapA Ω cat : délétion et insertion-inactivation dans le gène dapA de structure de la dihydrodipicolinate synthase (EC 4.2.1.52). Le gène est doublement inactivé (par délétion et insertion), et lorsque l'on inactive une chaîne métabolique il est plus judicieux d'inactiver le premier maillon. Cela évite en effet, l'accumulation

dans les cellules d'un intermédiaire métabolique qui peut être métabolisé par une autre enzyme de la cellule ;

- Δ lac : délétion de l'opération lactose. En effet, dans les expériences préliminaires, la production chromosomique inductible de β -galactosidase par les bactéries gênait l'interprétation des résultats après coloration des cellules Hela par X-Gal ;

- recA : déficience en recombinaison homologue. Cette mutation augmente la stabilité des réplicons extrachromosomiques.

10

Le plasmide pWR110 (pWR100::Tn5) a été introduit dans BM2710 par mobilisation plasmidique à l'aide du plasmide pOX38Gm (11), dérivé du facteur F dénué de séquences d'insertion et conférant la résistance à la gentamicine. Les vecteurs épisomiques pAT497 et intégratif pAT498 ont été

15

Au total les souches suivantes ont été construites :

- E. coli BM2710 (hôte) ;
- E. coli BM2710/pWR110 (contrôle négatif) ;
- E. coli BM2710/pWR110, pAT497 (donatrice) ;
- E. coli BM2710/pWR110, pAT498 (donatrice) ;
- E. coli BM2710/ pAT497 (contrôle négatif) ;
- E. coli BM2710/pAT498 (contrôle négatif).

20

25

3. Transfert direct d'ADN de E.coli aux cellules mammifères

Les vecteurs épisomiques pAT497 et intégratif pAT498 ont été transfectés dans la lignée humaine HeLa et la lignée humaine de carcinome pulmonaire A549 (ATCC CCL125) (15) ainsi que dans les cellules COS et CHO ; le criblage pour le transfert s'effectuant par production de β -

30

galactosidase (Tableau 2). L'absence de mycoplasme dans les lignées utilisées a été vérifiée dans le Laboratoire des Mycoplasmes, Institut Pasteur (Dr. D. ROULLAND-DUSSOIX) et dans le Laboratoire de Bactériologie, CHU Bordeaux (Pr. C. BEBEAR). Des transfectants ont été également obtenus dans les lignées A549, CHO après sélection par hygromycine B ou G418. Les clones étaient stables, après plus de deux mois de culture, mais exprimaient la β -galactosidase de façon hétérogène après plusieurs semaines en culture.

3.1. Le protocole de transfert est comme suit :

J1 :

a) Préparation des cellules réceptrices (plaques en double)

- on inocule des plaques 6 puits avec 2 ml de suspension cellulaire (soit - 5×10^4 cellules pour COS, 1×10^5 cellules pour CHO, 2×10^5 cellules pour HeLa et A 549) en milieu DMEM + L-glutamine (2 mM) et sérum de veau foetal (myoclone +, 10 %) ;
- on incube la nuit à 37°C en atmosphère enrichie à 5% en CO₂.

b) Préparation des bactéries donatrices

- On inocule une culture de 5 ml de bouillon Luria supplémenté avec 0,5 mM d'acide diaminopimélique et antibiotique(s) (100µg/ml d'ampiciline) ;
- on incube la nuit à 30°C avec agitation.

J2 :

- a) on incube 2 h à 37°C ;
- b) on ajoute aux cellules 2 ml de DMEM + L-glu (2mM) + SVF (myoclone +, 10 %) ;
- c) on centrifuge les bactéries, on resuspend dans le même milieu que les cellules et on ajoute la suspension bactérienne (de $1,5 \times 10^6$ à $2,5 \times 10^7$ bactéries selon la lignée cellulaire) dans 5 puits (1 contrôle sans bactérie par plaque) ;
- d) on centrifuge 10 mn à 500 g à 30°C .
- e) on incube 1h à 37°C ;
- f) on rince 3 fois avec 2 ml de DMEM ;

g) on incube 2 jours avec 5 ml de DMEM, L-glu (3 mM), SVF (myoclone +, 20 %), gentamicine (20 µg/ml).

J4 :

- a) on colore une plaque avec X-Gal pour le criblage de l'activité β -galactosidase (10) ;
b) on incube la deuxième plaque avec de l'hygromycine B (pAT497) ou du G418 (pAT498) pour sélectionner des clones résistants et on laisse incuber 2 à 4 semaines.

3.2. Résultats

L'ADN de six clones de A549 résistants à G418 obtenus indépendamment a été purifié par hybridation Southern avec une sonde spécifique du gène aph de AT498. Dans chaque transductant, un fragment d'ADN avec un mobilité électrophorétique indifférenciable de pAT498 était hybridé à la sonde. Ces résultats indiquent donc que pAT498 s'est intégré dans le génome des cellules réceptrices.

L'ADN total de transductants résistant à l'hygromycine B obtenus dans 4 expériences indépendantes, a été analysé de manière similaire en utilisant une sonde préparée à partir de vecteur réplcatif entier, Là encore, le profil d'hybridation est indifférenciable de celui de pAT497 excepté pour un ADN qui semble héberger un dimère délété dans lacZ de pAT497.

L'ADN du plasmide extrait des transductants n'était pas méthylé ce qui indique que pAT497 s'est bien répliqué dans les cellules réceptrices contrairement à celui des bactéries donnatrices.

Ces observations démontrent que contrairement à ce qui se passe dans les transferts par lipofection, l'ADN transféré est généralement intact et n'a subi aucune altération.

On a effectué quatre séries d'expériences avec des bactéries E. coli hébergeant ou non le plasmide pWR110. Les résultats sont rapportés dans le tableau 1 ci-après. Ils reflètent une moyenne d'un minimum de cinq expériences indépendantes. Un transfert a été observé seulement pour les

TABLEAU 1

Transfert direct d'ADN de E. coli BM2710 aux cellules de mammifères avec criblage pour la production de β -galactosidase

10

	<u>E. coli</u> BM 2710 hébergeant les plasmides	Lignée cellulaire			
		HeLa	CHO	CCS	A549
15	pWR100 + pAT 497	+ / ++	++	+++	+
	pAT 497	-	-	-	-
	pWR100 + pAT 498	++	+++	++ / ++	+
20	pAT 498	-	-	-	-

+/- : <20 cellules bleues par puits

+: 20 < cellules bleues par puits < 100

25 ++ : 100 < cellules bleues par puits < 500

+++ : 500 > cellules bleues par puits

Moyennes d'un minimum de cinq expériences indépendantes.

30 La méthode de transfert selon l'invention s'avère donc une technique originale de transfert d'ADN dans les cellules de mammifères, efficace, simple et économique. Elle est en outre à large spectre de cellules réceptrices. Elle permet le transfert de vecteurs tant répliatifs qu'intégratifs, ce qui présente un intérêt potentiel, non seulement pour la thérapie génique notamment de la mucoviscidose avec le ciblage des

cellules épithéliales du poumon, mais également pour celles des cancers digestifs ainsi que pour la vaccination par stimulation de l'immunité mucosale compte tenu du ciblage des cellules épithéliales et le transfert de gène ex vivo.

5

Les souches suivantes ont été déposées à la CNCM (Collection Nationale de Cultures de Microorganismes de l'Institut Pasteur, 25 rue du Docteur Roux, Paris 75724, Cédex 15) le 27 octobre 1995 :

10	<u>Références d'identification</u>	<u>Numéros d'enregistrement</u>
	<u>E. coli</u> BM2710	I - 1635
	<u>E. coli</u> BM 2710/pWR110	I - 1636
	<u>E. coli</u> BM2710/pWR110 + pAT497	I - 1637
15	<u>E. coli</u> BM2710/pWR110 + pAT498	I - 1638

BIBLIOGRAPHIE

1. Heinemann, J.A. & Sprague, G.F. *Nature* 340, 205-209 (1989).
2. Buchanan-Wollaston, V., Passiatore, J.E., & Cannon, F. *Nature* 328, 170-
5 175 (1987).
3. Falkow, S. *Cell* 65, 1099-1102 (1991).
4. Sansonetti, P.J., Kopecko, D.J. & Formal, S.B. *Infect. Immun.* 35, 852-860
10 (1982).
5. Sansonetti, P.J. et al. *Infect. Immun.* 39, 1392-1402 (1983).
6. Koch, A.L. & Woeste, S.J. *Bacteriol.* 174, 4811-4819 (1992).
15
7. Cohen, G.N. & Saint Girons, I. in *Escherichia coli and Salmonella typhimurium, Cellular and Molecular Biology* (eds Brooks Low, K., Ingraham, J.L., Magasanik, B., Neidhardt, F.C., Schaechter, M. & Umbarger, H.E.) 429-444 (American Society for Microbiology, Washington, D.C., 1987).
20
8. Sansonetti, P.J. et al. *Infect. Immun.* 60, 237-248 (1992).
9. Bachmann, B.J. in *Escherichia coli and Salmonella typhimurium, Cellular and Molecular Biology* (eds Brooks Low, K., Ingraham, J.L.,
25 Magasanik, B., Neidhardt, F.C., Schaechter, M. & Umbarger, H.E.) 1190-1219 (American Society for Microbiology, Washington, D.C., 1987).
10. Sanes, J.R., Rubenstein, J.L.R. & Nicolas, J.F. *EMBO J.* 5, 3133-3142 (1986).
- 30 11. Makris, J.C., Nordmann, P.L. & Renznikoff, W.S. *Proc. Natn. Acad. Sci. USA* 85, 2224-2228 (1988).
12. Yates, J.L., Warren, N. & Sugden, B. *Nature* 313, 812-815 (1985).

13. Kalderon et al. 1984 A short amino acid sequence able to specify nuclear location. *Celle* 39: 499-509.
14. Lauer et al. 1981. Construction of overproducers of the bacteriophage 434 repressor and coproteins. *J. Mol. Appl. Genet.* 1 : 139-147.
15. Giard et al. 1973 In vitro cultivation of human tumors : establishment of cell lines derived from a serie of solid tumors *J. Natl. Cancer Inst. (Bethesda)* 51 : 1417-1423.
16. Ferry, N. et al. *Proc. Natn. Acad. Sci. USA* 88, 8377-8381 (1991).
17. Brockbank, S.M. & Barth, P.T. *J. Bacteriol.* 175, 3269-3277 (1993).
18. Birnboim, H.C. and Doly, J. *Nucleic Acids Res.* 7, 1513-1523 (1979).

REVENDICATIONS

1. Système vectoriel capable de délivrer un fragment d'ADN étranger dans des cellules cibles eucaryotes, caractérisé en ce qu'il comprend une souche recombinante E. coli non pathogène et capable de pénétrer dans le cytoplasme desdites cellules, mais incapable d'y survivre, ladite souche E. coli étant en outre transformée par ledit fragment d'ADN étranger.
2. Système vectoriel selon la revendication 1, caractérisé en ce que ledit fragment d'ADN étranger comporte un fragment d'ADN codant pour une protéine d'intérêt placé sous le contrôle d'éléments de régulation dans lesdites cellules cibles.
3. Système vectoriel selon la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce que ladite souche E. coli est transformée par un vecteur réplcatif ou non dans E. coli portant ledit fragment d'ADN et le cas échéant lesdits éléments de régulation dans lesdites cellules eucaryotes.
4. Système vectoriel selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que ladite souche E. coli ne comporte pas de manière endogène de gène qui la rende capable de pénétrer et d'atteindre le cytoplasme desdites cellules eucaryotes cibles, et a été transformée par un ou plusieurs gènes, de préférence deux, provenant d'une ou respectivement plusieurs, de préférence deux autre(s) bactérie(s), lui conférant la capacité de pénétrer dans lesdites cellules eucaryotes et de lyser la membrane des vacuoles desdites cellules pour atteindre la cytoplasme.
5. Système vectoriel selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que lesdites cellules cibles eucaryotes correspondent à de cellules appartenant au spectre d'hôte de la bactérie dont est issu ledit gène conférant la capacité de pénétrer dans lesdites cellules.

6. Système vectoriel selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisé en ce que ladite souche E. coli héberge le plasmide pWR110 de la souche Shigella flexneri M90T.

5 7. Système vectoriel selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisé en ce que ladite souche E. coli est transformée par le gène codant pour l'hémolysine de Listeria monocytogènes ou d'une autre E. coli pathogène qui confère la propriété de lyser les membranes des vacuoles desdites cellules cibles.

10 8. Système vectoriel selon l'une des revendications 1 à 5 ou 7, caractérisé en ce que ladite souche E. coli est transformée par le gène d'invasion de la bactérie Yersinia enterocolytica ou Yersinia Pseudotuberculosis qui confère la propriété de pénétrer dans le
15 cytoplasme des cellules épithéliales.

 9. Système vectoriel selon l'une des revendications 1 à 8, caractérisé en ce que ladite souche E. coli a été rendue incapable de survie dans lesdites cellules en lysant dès son entrée dans le cytoplasme de cellules
20 eucaryotes.

 10. Système vectoriel selon la revendication 9, caractérisé en ce que ladite souche E. coli a été modifiée de manière à être rendue auxotrophe pour l'acide diaminopimélique.
25

 11. Système vectoriel selon l'une des revendications 2 à 10, caractérisé en ce que ledit vecteur portant ledit fragment d'ADN étranger comporte en outre des éléments permettant l'intégration dans le génome des cellules eucaryotes cibles.
30

 12. Système vectoriel selon l'une des revendications 2 à 11, caractérisé en ce que ledit vecteur portant le fragment d'ADN d'intérêt comporte en outre, une origine de répllication permettant au vecteur de se répliquer de façon extra chromosomique dans lesdites cellules eucaryotes
35 cibles.

13. Système vectoriel selon l'une des revendications 1 à 11, caractérisé en ce que le gène dapA codant pour l'enzyme dihydrodipicolinate synthase est inactivée.

5 14. Système vectoriel selon l'une des revendications 1 à 13, caractérisé en ce que lesdites cellules eucaryotes sont des cellules de mammifères.

10 15. Système vectoriel selon l'une des revendications 1 à 13, caractérisé en ce que lesdites cellules eucaryotes sont des cellules de levures ou de plantes.

15 16. Un système vectoriel selon l'une des revendications précédentes pour une utilisation thérapeutique.

20 17. Méthode de transfert in vivo d'ADN dans des cellules eucaryotes, caractérisée en ce qu'on utilise un système vectoriel selon l'une des revendications 1 à 13 et 15, lesdites cellules n'étant pas des cellules animales ou humaines.

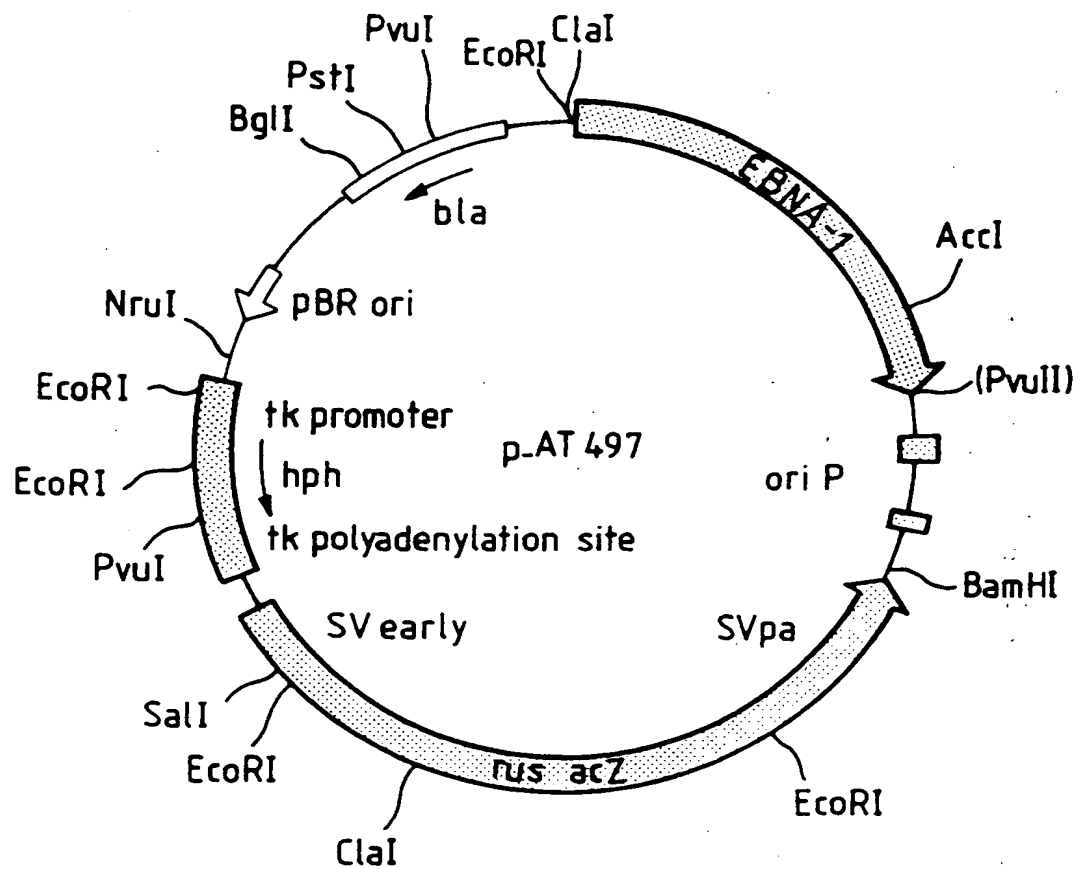
25 18. Méthode de transfert in vitro ou ex vivo d'ADN dans des cellules eucaryotes, caractérisée en ce qu'on utilise un système vectoriel selon l'une des revendications 1 à 16.

30 19. Cellules obtenues par la méthode selon la revendication 18.

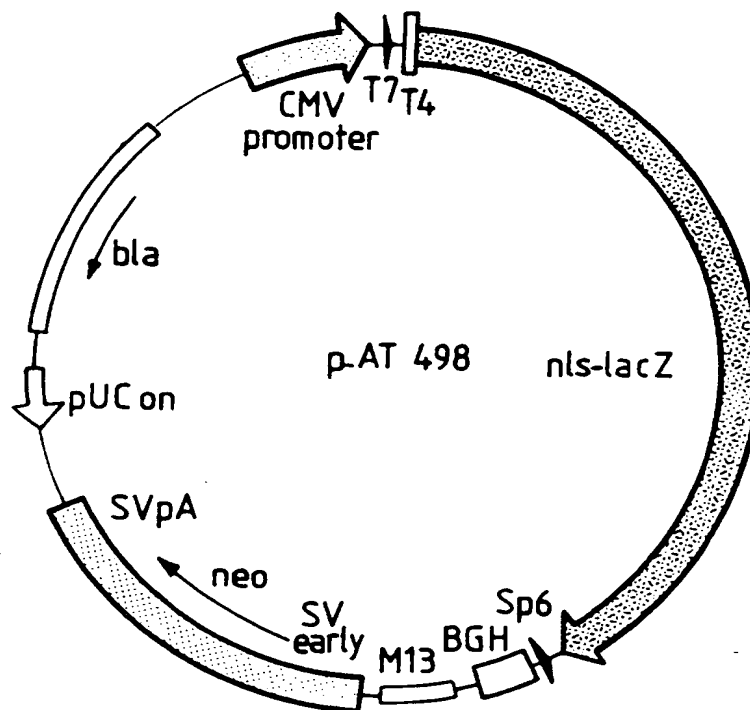
20. Souche d'E. coli choisie parmi les souches suivantes, déposées à la CNCM (Collection Nationale de Cultures de Microorganismes de l'Institut Pasteur) le 27 octobre 1995 :

30 <u>E. coli</u> BM2710	n° I - 1635
<u>E. coli</u> BM 2710/pWR110	n° I - 1636
<u>E. coli</u> BM2710/pWR110 + pAT497	n° I - 1637
<u>E. coli</u> BM2710/pWR110 + pAT498	n° I - 1638.

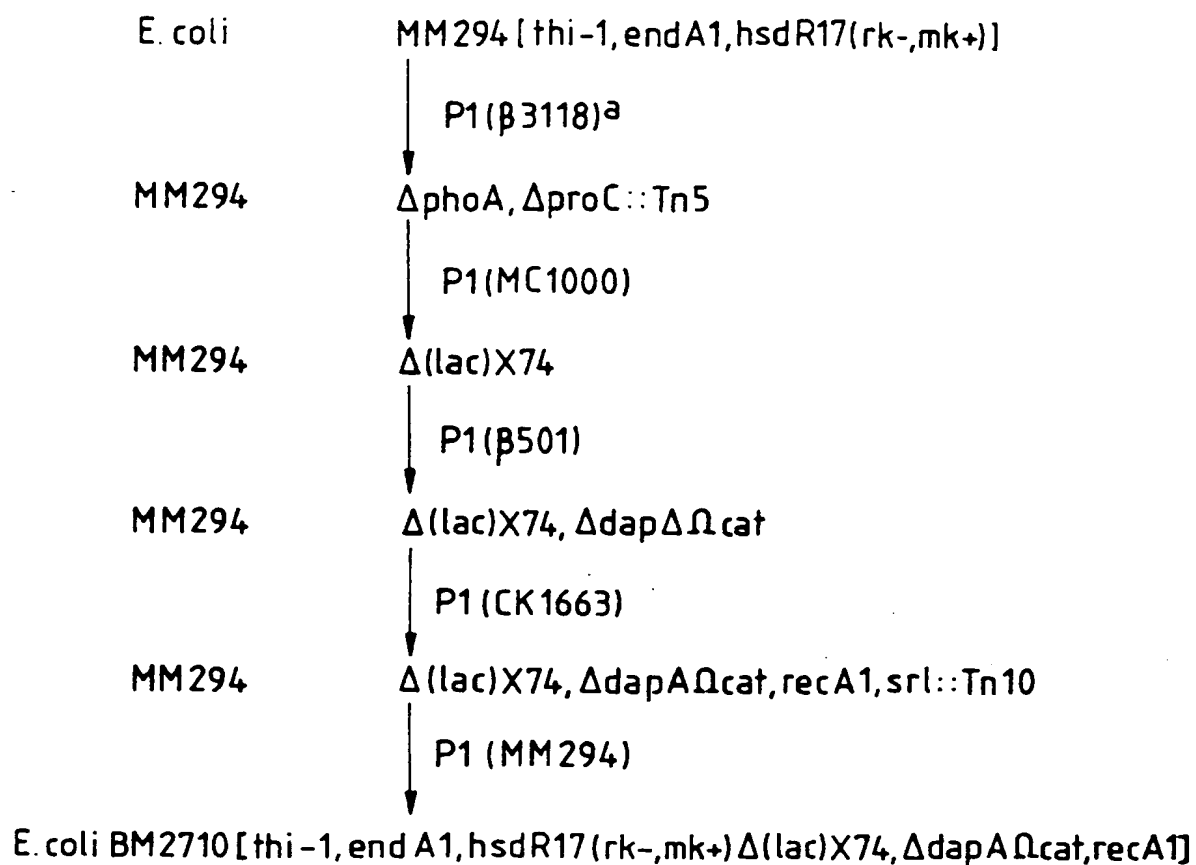
1/4

FIG_1

2/4

FIG_2

3/4



FIG_3 - Construction de E.coli BM2710

a) Les souches sur lesquelles ont été propagés les bactériophages sont indiquées entre parenthèses

4/4

E.coli C600/pOXGm x S.flexneri M90T/pWR110
(Tra⁺) (pWR100::Tn5)
(Tra⁻, MOB⁺)

→ [S.flexneri/pWR110+pOXGm] x E.coli BM2710
(Km^R) (Cm^R)

→ E.coli BM2710/pWR110+pOXGm
(Cm^R) (Km^R)

Perte spontanée de pOXGm → E.coli BM2710/pWR110

FIG_4_Construction de E.coli BM2710/pWR110.

INSTITUT NATIONAL

de la

PROPRIETE INDUSTRIELLE

RAPPORT DE RECHERCHE
PRELIMINAIREétabli sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

FA 523661

FR 9515556

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
Y	BIOSYSTEMS, 1993, 29, 37-48, XP002015547 HEITMANN D ET AL: "FREQUENCY AND CONDITIONS OF SPONTANEOUS PLASMID TRANSFER FROM ESCHERICHIA-COLI TO CULTURED-MAMMALIAN-CELLS" * le document en entier *	1-14, 16-20
D,Y	NATURE (LONDON), 340 (6230). 1989. 205-209., XP002015548 HEINEMANN J A ET AL: "BACTERIAL CONJUGATIVE PLASMIDS MOBILIZE DNA TRANSFER BETWEEN BACTERIA AND YEAST" * le document en entier *	15
Y	INFECTION AND IMMUNITY, 39 (3). 1983. 1392-1402., XP002015549 SANSONETTI P J ET AL: "ALTERATIONS IN THE PATHOGENICITY OF ESCHERICHIA-COLI K-12 AFTER TRANSFER OF PLASMID AND CHROMOSOMAL GENES FROM SHIGELLA-FLEXNERI" * le document en entier *	1-20
Y	ANN. INST. PASTEUR/MICROBIOL. (1986), 137A(1), 79-87 CODEN: AIPME3, XP002015550 DUCLUZEAU, R. ET AL: "Implantation of a mutant of Escherichia coli requiring diaminopimelic acid in the digestive tract of gnotobiotic mice" * le document en entier *	1-20
A	WO-A-90 12867 (UNIV LELAND STANFORD JUNIOR) 1 Novembre 1990 * revendications 1-20 *	1-20
A	EP-A-0 211 543 (UNIV LELAND STANFORD JUNIOR) 25 Février 1987 * revendications 1-11 *	1-20
-/-		
Date d'achèvement de la recherche		Examinateur
10 Octobre 1996		Gurdjian, D
<p>CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES</p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons A : membre de la même famille, document correspondant</p>		

EPO FORM 1503 01.82 (P04C13)

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
A	FR-A-2 564 482 (INT GENETIC SCIENCES) 22 Novembre 1985 * revendications 1-10 *	1-20
A	INFECT. IMMUN. (1992), 60(6), 2218-24 CODEN: INFIBR;ISSN: 0019-9567, XP002015551 KOTLOFF, KAREN L. ET AL: "Safety, immunogenicity, and efficacy in monkeys and humans of invasive Escherichia coli K-12 hybrid vaccine candidates expressing Shigella flexneri 2a somatic antigen" * le document en entier *	1-20
T	C. R. ACAD. SCI., SER. III (1995), 318(12), 1207-12 CODEN: CRASEV;ISSN: 0764-4469, 8 Janvier 1996, XP002015552 COURVALIN, PATRICE ET AL: "Gene transfer from bacteria to mammalian cells" * le document en entier *	1-20
		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int. CL. 6)
Date d'achèvement de la recherche		Examinateur
10 Octobre 1996		Gurdjian, D
<p>CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES</p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons A : membre de la même famille, document correspondant</p>		

1

EPO FORM 1503 01.82 (P/MCI.1)